

# 奶粉中三聚氰胺的快速检测研究

南海娟, 魏新军, 张永生, 贾蕾蕾  
(河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:**以奶粉为试验材料,研究了奶粉中三聚氰胺的定性检测方法。结果表明:苦味酸与三聚氰胺有沉淀反应,可作为定性检测试剂,最低检测限为 5 g/kg。

**关键词:**奶粉;三聚氰胺;苦味酸

**中图分类号:**R155.57 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-874X(2010)02-0189-03

## The research of rapid detection methods to melamine in milk powder

NAN Hai-juan, WEI Xin-jun, ZHANG Yong-sheng, JIA Lei-lei  
(College of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** In this paper, milk powder was used as raw material and the qualitative detection method to melamine in milk powder had been studied. The results showed that there were precipitation between picric acid and melamine, and picric acid could be used to qualitative detect melamine. Minimum detectable concentration of melamine was 5 g/kg.

**Key words:** milk powder; melamine; picric acid

三聚氰胺(Melamine),化学式: $C_3H_6N_6$ ,俗称密胺、蛋白精,IUPAC命名为1,3,5-三嗪-2,4,6-三氨基,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,通常被用作化工原料<sup>[1]</sup>。由于食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷,三聚氰胺常被不法商人用作食品添加剂,借以提升食品检测中的蛋白质含量指标。2008年的“三鹿奶粉”事件引起了全国甚至世界范围内对乳剂乳制品中添加三聚氰胺的重视,因此对奶粉中三聚氰胺进行快速检测研究具有非常重要的意义。

目前国内外检验三聚氰胺的方法主要有高效液相色谱法(HPLC),液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS),气相色谱-质谱法(GC-MS),气相色谱-质谱/质谱法(GC-MS/MS),免疫反应等方法,这些方法存在明显的优点:检测极限低,测量结果准确等。但缺点也相当突出:如仪器昂贵,不容易普及,试剂不容易保存等,特别是样品的前处理十分复杂,尤其对于难以挥发的三聚氰胺在气相色谱-质谱联用法中需要用衍生化试剂衍生化处理,使之变成沸点相对较低的物质,更是增

加了检测的难度。本研究摸索出一套前处理简单,试剂易得,价廉,容易普及的快速筛选方法,同时对其他食品中三聚氰胺的检测具有重要的参考价值。现将试验结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试材料为红星邦智多奶粉,由黑龙江红星集团股份有限公司生产。

试验使用的试剂有:三聚氰胺、苦味酸、硫酸锌、乙酸锌、冰乙酸、亚铁氰化钾、氢氧化钠、茚三酮等,均为分析纯。

试验使用的仪器有:分析天平为MD100-2型,上海天平仪器厂产品;电子天平为ALC-2100.2型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品;电炉。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质沉淀剂的配制 参考文献[2]配制蛋白质沉淀剂。乙酸锌溶液:称取21.9 g乙酸锌,加3 mL冰乙酸,加水溶解并稀释至100 mL;亚铁氰化钾溶液:称取10.6 g亚铁氰化钾加水溶解并稀释至100 mL;0.50 mol/L氢氧化钠:称取2 g氢氧化钠加水溶

收稿日期:2009-10-13

作者简介:南海娟(1974-),女,硕士,实验师,E-mail:nanhaijuan1@163.com

解冷却后定容至 100 mL;0.42 mol/L 硫酸锌:准确称取 12.0775 g 硫酸锌加水溶解后定容至 100 mL;0.1%茛三酮:称取 0.1 g 茛三酮,用水定容至 100 mL。

### 1.2.2 蛋白质沉淀剂的选择 无机盐沉淀剂的选择:

(1)样品处理:称取 25.0 mg 三聚氰胺分别置于 1、2、3、4 号 250 mL 容量瓶中,各加 50 mL 水,加热溶解后,1、2、3 号瓶各加 2.0 g 奶粉溶解,振荡摇匀。(2)沉淀方法:1 号瓶加入 5 mL 乙酸锌溶液及 5 mL 亚铁氰化钾溶液;2 号瓶加入 5 mL 氢氧化钠及 5 mL 乙酸锌溶液;3 号瓶加入 5 mL 氢氧化钠及 5 mL 硫酸锌;4 号瓶加水溶解定容至 250 mL,作为对照。分别加水至刻度,混匀,沉淀,静置 30 min,用干燥滤纸过滤,滤液备用<sup>[2]</sup>。(3)沉淀效果鉴定:分别取 1、2、3 号瓶上清过滤液和 4 号瓶水溶液 1 mL 各加入 0.5 mL 0.1%茛三酮溶液摇匀后,在沸水浴中加热 3 min,将 1、2、3 号液体与 4 号比较,看溶液是否变蓝。如果变蓝,说明蛋白质没有完全沉淀;没有颜色变化说明蛋白质沉淀完全。(4)鉴定三聚氰胺是否被部分沉淀:分别取 1、2、3 号上清液及 4 号水溶液 5 mL 各加入饱和苦味酸水溶液 0.5 mL,摇匀后静置,将 1、2、3 号液体与 4 号液体比较,看 1、2、3 号液体是否会出现沉淀。

有机沉淀剂的选择:分别称取 25.0 mg 三聚氰胺于 5、6 号两支试管中,7 号试管不加三聚氰胺。分别添加 10 mL 水溶解,再加 2.0 g 奶粉溶解,振荡摇匀后,加不同量的乙腈振荡提取 6 min,静置 10 min,双层滤纸加一层脱脂棉过滤,上清液作为提取液待用<sup>[3-4]</sup>。沉淀效果检验方法同无机盐沉淀剂。将无机盐和乙腈的沉淀效果进行比较,找出最佳沉淀剂和沉淀剂的用量。

1.2.3 定性检测条件的确定 检测条件的确定:(1)称取 25.0 mg 三聚氰胺溶解于 50 mL 水中,称取 2.0 g 奶粉移入溶液中溶解,加入 5 mL 乙酸锌溶液及 5 mL 亚铁氰化钾溶液,定容至 250 mL,摇匀。取 5 mL 该溶液于 8 号试管,加 0.5 mL 饱和苦味酸溶液。(2)称取 25.0 mg 三聚氰胺于试管中,加 10 mL 水溶解后,再加入 2.0 g 奶粉溶解,振荡摇匀后,加 25 mL 乙腈,振荡提取 6 min,取 5 mL 该溶液于 9 号试管,加 0.5 mL 饱和苦味酸溶液;(3)取 4 号溶液 5 mL 于 10 号试管,加入 0.5 mL 饱和苦味酸溶液作为对照,检验经无机盐和有机物沉淀蛋白质后,苦味酸是否和奶粉上清液中三聚氰胺发生沉淀反应。

1.2.4 检测限的确定 按照已选出蛋白质沉淀剂的用量,将事先加入不同质量三聚氰胺的奶粉先经蛋白质沉淀,然后过滤,取滤液 5 mL,向其中滴加饱和苦味酸,试验能够出现沉淀的奶粉中三聚氰胺的最低浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 无机盐沉淀剂的选择

不同无机盐溶液沉淀蛋白之后,用茛三酮检验蛋白质是否沉淀完全,结果表明,4 号(CK)试管中溶液为无色,说明茛三酮与三聚氰胺无颜色反应,1(乙酸锌/亚铁氰化钾)、2(乙酸锌/氢氧化钠)、3 号(硫酸锌/氢氧化钠)试管中溶液均无蓝色产生,说明此 3 种沉淀剂都能将奶粉中的蛋白质完全沉淀下来。

取 25.0 mg 三聚氰胺和 2.0 g 奶粉用乙酸锌/亚铁氰化钾、乙酸锌/氢氧化钠、硫酸锌/氢氧化钠 3 种试剂和水(CK)将蛋白质沉淀,分别取各自上清液 5 mL 于试管中,每管加等体积苦味酸,检验三聚氰胺是否被沉淀,结果表明,水溶液(CK)试管中出现黄色沉淀,说明三聚氰胺和苦味酸反应能够产生黄色沉淀现象;乙酸锌/氢氧化钠和硫酸锌/氢氧化钠溶液试管中没有出现黄色沉淀,说明无机盐沉淀蛋白质的同时将三聚氰胺也沉淀下来,因此这 2 种沉淀剂不能用来沉淀蛋白质。乙酸锌/亚铁氰化钾试管中出现黄色沉淀,说明用乙酸锌/亚铁氰化钾沉淀蛋白质时三聚氰胺没有被沉淀。因此可选用乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀奶粉中蛋白质。

### 2.2 有机物沉淀剂的选择

称取 2.00 g 奶粉加 10 mL 水溶解后加入 15、20、25 mL 的乙腈沉淀蛋白质,用茛三酮检验蛋白质是否沉淀完全,结果表明:当乙腈加入量为 15、20、25 mL 时,0.1%茛三酮水溶液检验溶液为深蓝色、淡蓝色、无色,所以取 25 mL 乙腈沉淀蛋白质。用乙腈沉淀的最佳条件为:奶粉(g):水(mL):乙腈(mL)=2:1:25;振荡 6 min,静置 10 min,用双层滤纸和一层脱脂棉过滤。

### 2.3 定性检测条件的确定

用苦味酸作为定性检测试剂,在不同检测体系中的检测结果为:8 号试管(三聚氰胺水溶液)呈黄色沉淀、9 号试管(含三聚氰胺的奶粉用乙酸锌/亚铁氰化钾沉淀后的上清液)呈黄色沉淀、10 号试管(含三聚氰胺的奶粉用乙腈沉淀后的上清液)呈黄色澄清。

从结果可以看出,在水溶液及经乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白质的奶粉上清液中,苦味酸能与三

聚氰胺发生沉淀反应,而在乙腈沉淀蛋白质的奶粉上清液中,苦味酸与三聚氰胺没有沉淀反应。试验过程中,将有黄色沉淀的水溶液和奶粉上清液分别加入乙腈,黄色沉淀消失,说明苦味酸作为定性检测试剂仅能用于乙酸锌和亚铁氰化钾沉淀蛋白质的奶粉上清液中。

#### 2.4 定性检测线的确定

含不同浓度三聚氰胺的奶粉上清液滴加饱和苦味酸溶液后,产生的现象不同。当浓度达到 5 g/kg 后,滴加苦味酸,有黄色沉淀产生,且浓度越大,沉淀越多,低于此浓度,无沉淀及其他现象产生,因此确定饱和苦味酸的最低检测线为 5 g/kg。

### 3 结论与讨论

用苦味酸检测奶粉中三聚氰胺的最佳条件为:称取 2.0 g 奶粉,加 50 mL 水溶解后,加入 5 mL 乙酸锌溶液及 5 mL 亚铁氰化钾溶液,定容至 250 mL,摇匀,沉淀蛋白质后过滤,取 5 mL 滤液于试管中,加 0.5 mL 饱和苦味酸溶液,若出现黄色沉淀,说明奶粉中三聚氰胺的含量高于 5 g/kg。沉淀越多,三聚氰胺的含量越高。

本研究用苦味酸能与三聚氰胺发生沉淀反应的现

象,先将奶粉中的蛋白质沉淀,然后加入苦味酸进行检测,结果用肉眼即可判断,且样品前处理简单,试剂易得,价廉,容易普及,可作为奶粉中是否含有三聚氰胺的大量样品的快速初筛方法,同时对其他食品中三聚氰胺的检测具有重要的参考价值。

虽然我国国家规定的三聚氰胺在奶粉中的限量值为 1 mg/kg,远远低于此方法检测限。由于市场中奶粉种类繁多,奶粉包装中也含三聚氰胺,长期贮存,可能渗入到奶粉中,实际情况中奶粉的三聚氰胺含量可能会达到 5 g/kg 以上。因此该方法尽管检测限高,不是特别理想,但还是具有一定的借鉴意义。对此方法进行改进,使检测限在国标之内正在进一步研究之中。

#### 参考文献:

- [1] 王会串.三聚氰胺的生产技术和应用前景[J].精细与专用化学品,2007,15(11):33-36.
- [2] 孙艳丽,刘鲁林,木泰华.甘薯叶片可溶性蛋白提取方法探索及其成分分析[J].食品工业科技,2006(11):88-91.
- [3] 食品安全快速检测网.乳品中三聚氰胺速测盒[EB/OL].http://www.china12315.com.cn/product/proDetail.asp?id=289,2008-12-12.
- [4] GB/T22400-2008.原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法[S].

(上接第 176 页)

研磨腰果叶片时加入酚氧化酶抑制剂 DIECA,阻止酚类物质的氧化,避免其与 DNA 的不可逆结合,可提高 DNA 的纯度和提取率。在提取液中加入适量 2%  $\beta$ -巯基乙醇和酚结合剂 PVP30,能有效地抑制酚类物质氧化和去除腰果叶片中富含的酚类物质。

在本改良的试验方法中,样品要充分研磨,可以保证温浴时样品与提取缓冲液的充分混匀,得到 DNA 的高提取率。在消除蛋白质、多糖、色素等杂质时,用氯仿/异戊醇抽提时动作要轻柔,避免 DNA 受到外界机械力的剪切和断裂成小片段。吸取离心上清液时要使用剪去尖端的吸头,操作应温和,以保证 DNA 完整性,注意不能吸入中间层的蛋白质,否则会影响 DNA 的纯度。DNA 洗涤要充分,去除 DNA 所含的小分子杂质,以保证其纯度。充分洗涤后的 DNA 样品要充分干燥,以去除其中残留的乙醇,防止其抑制后续的酶切及 PCR 反应。不要过度干燥,否则 DNA 会很难溶解。

本试验在 CTAB 法基础上进行了改进,提取的腰果总 DNA 纯度高、质量好,可直接用于 DNA 的分子标记试验,是高效提取腰果叶片 DNA 的可行试验方法。

#### 参考文献:

- [1] 海南省统计局.海南统计年鉴(2004)[M].北京:中国统计出版社,2004:264-265.
- [2] 中国热带作物学会热带园艺专业委员会,中国热带农业科学院南亚热带作物研究所.南方优稀果树栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2009:180-181.
- [3] Das Sudripta, Jha Timir B, Jha Sumita. In vitro propagation of cashewnut[J].Plant Cell Reports, 1996, 15(8): 615-619.
- [4] Jha T B. In vitro morphogenesis in cashew nut Anacardium occidentale L[J].Indian Journal of Experimental Biology, 1988, 26: 505-507.
- [5] Logemann Jürgen, Schell Jeff, Willmitzer Lothar. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J].Analytical Biochemistry, 1987, 163(1): 16-20.
- [6] Loomis W D.Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles[J].Methods in Enzymology,1974,31(Part A):528-544.
- [7] Vroh Bi I, Harvengt L, Chandelier A, et al.Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction [J].Plant Breeding, 1996,115(3):205-206.